

【基础研究】

通信作者:赵习德(1960-),男,河南延津人,学士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合治疗心血管疾病;桑文凤(1962-),女,河南延津人,硕士,副教授,主要从事临床护理教学与研究。

近年研究显示,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症过程,腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)及细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、白细胞介素(interleukin, IL)等炎症因子在 AS 的发生发展过程中起重要作用^[1-2], 先前通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)建立 AS 模型的实验也得到证实^[3], 因此,有效抑制炎症介质 ICAM-1、IL 等作用途径将是治疗 AS 的方法之一。黄连解毒汤是清热解毒的代表方,其组方首载葛洪《备急要方》,现临床主要用于感染性、炎症性等相关疾病,并得到了满意疗效^[4-5]。本研究观察黄连解毒汤对 LPS 所致炎症损伤内皮细胞 AMPK 及 ICAM-1 的影响,旨在为临床防治 AS 提供新的思路和资料。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 TS100-F 型倒置显微镜、荧光显微镜(日本 Nikon 公司);CO₂ 培养箱、酶标仪(美国 Thermo 公司);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司);凝胶成像及图像分析系统(上海天能公司);电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);LPS(美国 Sigma 公司);噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)DMEM 液体培养基(美国 HyClone 公司);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记抗人血管性血友病(VonWillebrand, vWF)抗体(上海瑞齐实业有限公司);抗人 AMPK α 抗体、抗人磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(phosphorylation-AMPK, P-AMPK) α 抗体、抗人 β -actin 抗体(美国 Signaling Technology 公司);兔抗人 ICAM-1(美国 PeproTech 公司);FITC 标记羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗人抗体(北京博奥森生物技术公司);增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒(美国 Pierce 公司);5-氨基-4-咪唑甲酰胺核糖核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, AICAR)(美国 TRC 公司);黄连、黄芩、黄柏、栀子颗粒(华润三九医药股份有限公司)。

1.2 细胞培养 无菌条件下取新生婴儿脐带(取自新乡医学院第一附属医院妇产科,家长均知情同意,并经医院伦理委员会批准),用 37℃ 预热生理盐水快速洗净脐静脉血,止血钳夹闭脐带一端,从另一端注入质量分数 0.25% 胰蛋白酶和质量分数 0.02% 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)混合液,置 37℃ 培养箱消化 10 min 收集消化液,加入含体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,离心、洗涤细胞 3 次,加入全培养

基(DMEM 培养基、体积分数 20% 胎牛血清、青霉素 10 万 U \cdot L⁻¹、链霉素 100 mg \cdot L⁻¹)于 37℃、体积分数 5% CO₂、100% 湿度培养箱中培养,2~3 d 换液 1 次,当细胞长满培养瓶底按 1:2 进行细胞传代,培养至 P₂ 代进行细胞鉴定。

1.3 细胞免疫荧光鉴定 将长满培养瓶底的 P₂ 代细胞用质量分数 0.25% 胰蛋白酶和质量分数 0.02% EDTA 液 1:1 混匀后进行消化,制备细胞悬液,进行细胞爬片培养,当细胞长满盖玻片,用标准固定液固定 15 min,弃固定液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗 3 次,加体积分数 0.3% TrionX-100 PBS 液处理 20 min, PBS 冲洗 3 次,山羊血清封闭 30 min, PBS 冲洗 3 次,在暗室内加入 FITC 标记抗人 vWF 抗体,室温下湿盒内避光孵育 1.5 h,吸弃二抗并用 PBS 冲洗 3 次,吸水纸吸掉细胞爬片上的液体,用碱性缓冲甘油封片,暗室内荧光显微镜下观察细胞爬片。

1.4 各组细胞干预 将培养至 P₃ 代的细胞分为空白组、对照组(AICAR 干预)和观察组(黄连解毒汤干预),每组设 6 个复孔,均以 1 mg \cdot L⁻¹ LPS 终末全培养基浓度加入各组,持续培养 3 h 后,弃上清液,洗涤 3 次,空白组加入全培养基,对照组加入含 AICAR(0.5 mmol \cdot L⁻¹)^[6] 全培养基,观察组加入含黄连解毒汤(折合中药饮片 0.256 g \cdot L⁻¹)^[7] 全培养基,继续培养 16 h 后待用。其中黄连解毒汤的药物组成按原方黄连:黄芩:黄柏:栀子(质量比)3:2:2:3 进行配伍,将黄连、黄芩、黄柏、栀子颗粒直接溶解蒸馏水中使用。

1.5 Western blot 法检测各组 AMPK 水平及 P-AMPK 表达量 各组细胞按 1.4 的方法干预后分别提取细胞总蛋白,采用 Bradford 法计算出样品总蛋白浓度(g \cdot L⁻¹),调整蛋白浓度,将蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到乙酸纤维膜上,质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入一抗:抗人 AMPK α 抗体、抗人 P-AMPK α 抗体、抗人 β -actin 抗体,4℃ 冰箱内孵育过夜,洗涤后加入二抗:辣根过氧化物酶标记的羊抗人抗体,室温下孵育 1.5 h,洗涤后加入适量 ECL 底物反应 5 min,显影、曝光,采用 Quantity one 凝胶成像分析仪对条带进行定量,确定目的条带灰度值, β -actin 杂交条带灰度值作内参进行校正,计算出各样本蛋白质 AMPK 及 P-AMPK 相对灰度值。

1.6 流式细胞仪检测各组 ICAM-1 的表达情况 各组细胞按 1.4 的方法干预后制备细胞悬液,用标准固定液固定 15 min,离心洗涤 3 次,加体积分数 0.3% TrionX-100 PBS 液处理 20 min, PBS 离心洗涤

3次,加山羊血清封闭30 min, PBS 离心洗涤3次后调整细胞浓度为 10^6 L^{-1} ,等量加入空白组管、对照组管、观察组管,加一抗(兔抗人 ICAM-1), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜, PBS 离心洗涤3次,在暗室内滴加二抗(FITC 标记羊抗兔 IgG),室温下湿盒内避光孵育1.5 h, PBS 离心洗涤2次,每管加入500 μL PBS 液,上机检测各组细胞的荧光强度,重复测量6次。

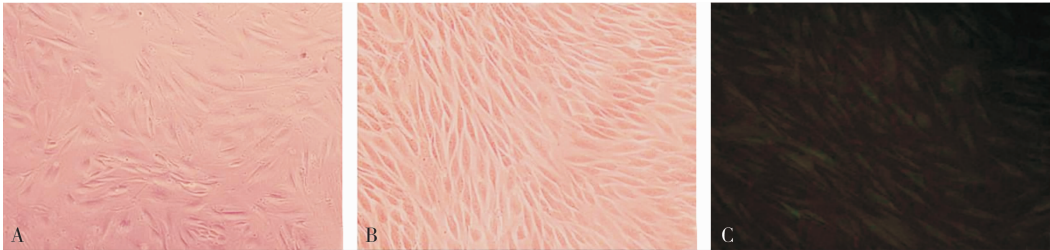
1.7 MTT 法检测细胞存活情况 P_3 代细胞制备细胞悬液等量加入96孔培养板内培养,当细胞长满培养板底,均以 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 终末全培养基浓度加入各组,培养箱内培养3 h,加入 MTT 液上酶标仪测量490 nm 处光密度(optical density, OD)值(此时间点记为0 h),剩余细胞按空白组加入全培养基、对照组加入含 AICAR($0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[7]全培养基、观察组加入含黄连解毒汤($0.256\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)全培养基

进行干预,每6 h 各组均加入 MTT 液上酶标仪测量 OD 值,每组每次测量6孔,连续测量30 h,比较各组细胞的存活情况。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间总体均数差异的比较采用完全随机设计的 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮细胞形态学及免疫荧光鉴定结果 原代培养7 d后倒置显微镜下观察,细胞呈类鹅卵石样排列,呈椭圆形、梭形、三角形及多边形(图1A)。传代培养7 d后内皮细胞呈单层排列,形状多为梭形(图1B)。荧光显微镜下观察到 FITC 标记抗人 vWF 内皮细胞特异性标志阳性(图1C)。



A:原代培养7 d;B:传代培养7 d;C:FITC 标记抗人 vWF 内皮细胞。

图1 内皮细胞形态学及免疫荧光鉴定阳性($\times 200$)

Fig.1 Morphology of endothelial cells and positive result of immunofluorescence identification($\times 200$)

2.2 各组内皮细胞 AMPK 水平及 P-AMPK 表达量比较 结果见表1。空白组、观察组、对照组之间内皮细胞 AMPK 含量的相对灰度值差异均无统计学意义($P>0.05$)。观察组、对照组内皮细胞 P-AMPK 表达量的相对灰度值明显高于空白组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组内皮细胞 P-AMPK 含量的相对灰度值与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 各组 ICAM-1 表达量比较 空白组、对照组、观察组内皮细胞 ICAM-1 荧光强度分别为 129.13 ± 15.72 , 8.37 ± 2.16 , 8.94 ± 3.21 ,观察组、对照组均较空白组明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$);观察组与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表2 各组内皮细胞存活情况比较

Tab.2 Comparison of survival result of endothelial cells among all the groups

组别	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h
空白组	1.72 ± 0.04	1.01 ± 0.08	0.32 ± 0.12	0.23 ± 0.08	0.17 ± 0.07	0.03 ± 0.01
对照组	1.73 ± 0.06	1.20 ± 0.06	1.02 ± 0.13^a	0.96 ± 0.14^a	1.16 ± 0.09^a	1.16 ± 0.08^a
观察组	1.74 ± 0.04	1.17 ± 0.11	0.95 ± 0.11^a	0.99 ± 0.10^a	1.15 ± 0.11^a	1.16 ± 0.12^a

注:与空白组比较^a $P<0.05$ 。

表1 各组内皮细胞 AMPK 及 P-AMPK 相对灰度值

Tab.1 Opposing gray scale of AMPK and P-AMPK of endothelial cells in all the groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	AMPK 相对灰度值	P-AMPK 相对灰度值
空白组	0.48 ± 0.16	0.24 ± 0.09
观察组	0.51 ± 0.18	0.39 ± 0.14^a
对照组	0.50 ± 0.13	0.41 ± 0.11^a

注:与空白组比较^a $P<0.05$ 。

2.4 各组内皮细胞存活情况比较 结果见表2。自12 h 开始,对照组和观察组的内皮细胞存活与空白组对比差异有统计学意义($P<0.05$);观察组与对照组比较内皮细胞存活差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

目前认为冠状动脉粥样硬化性心脏病的发生发

展主要与内皮细胞功能的异常和血脂代谢异常有密切关系,而内皮细胞的损伤大多由炎症所致,相关研究支持这是一个慢性炎症过程^[1-2]。血管内皮损伤

后,其细胞代谢功能紊乱,细胞间的致密性等防御功能丧失,加上炎症因子的黏附及血中脂肪沉积等变化引起 AS 的逐渐形成。而激活 AMPK 可抑制核转录因子- κ B 信号途径来抵抗炎症反应,维持机体健康并延缓衰老;AMPK 活性降低,脂肪酸氧化降低,甘油二酯积累增加^[6],造成血脂水平升高,所以研究如何通过调控 AMPK 活性控制炎症对血管内皮的损伤及恢复损伤内皮细胞的功能是防治 AS 的关键所在。AMPK 对能量的代谢在细胞水平及整个生物水平都起着重要的作用,其通过磷酸腺苷浓度的增加或通过上游激酶丝氨酸/苏氨酸激酶 11、钙离子/钙调素依赖性蛋白激酶 β 、转化生长因子- β 激活的蛋白激酶 1 磷酸化 AMPK α 亚基来激活 AMPK^[6]。AMPK 活性受损可以诱导损伤与代谢综合征包括肥胖、糖尿病和心血管疾病联系起来,而这些疾病都涉及慢性炎症的存在^[8-9]。文献已证实黄连解毒汤有抗炎作用^[10],通过本实验进一步得到印证,并可能揭示了黄连解毒汤有保护炎症损伤血管内皮细胞的作用。

Bai 等^[11]研究发现,在 LPS 诱导的炎症反应中,AICAR 通过激活 AMPK 可抑制发生的炎症反应。本实验以 AICAR 干预的内皮细胞作为对照组,应用黄连解毒汤干预炎症损伤的内皮细胞,结果显示,与空白组比较,各组 AMPK 水平基本相同,而观察组和对照组的 P-AMPK 水平较空白组均明显增高,提示黄连解毒汤与 AICAR 均不能提高 AMPK 水平,但能促进 AMPK 的活化,即磷酸化为 P-AMPK,从而使 P-AMPK 水平增高起到抑制内皮细胞炎症反应的作用,且观察组与对照组之间比较差异无统计学意义,提示黄连解毒汤有与 AICAR 相同的抗炎作用效果。

ICAM-1 是主要的炎症介质之一,炎症刺激诱导 ICAM-1 表达,介导白细胞与血管内皮间的炎症反应,促进炎症的发生发展^[12-13]。在 AS 形成过程中,ICAM-1 介导单核细胞黏附于内皮细胞,并游走至内皮下,分化为巨噬细胞,吞噬脂质成为泡沫细胞而参与形成 AS^[14]。流式细胞仪测定结果显示,黄连解毒汤、AICAR 干预炎症损伤内皮细胞后,与空白组对比,观察组和对对照组 ICAM-1 的表达量明显少,且观察组与对照组 ICAM-1 的表达无明显差异,提示黄连解毒汤、AICAR 均能抑制 ICAM-1 的表达,减少炎症介质的产生,起到抗炎作用,这与李岩等^[15]的研究结果相符。另外,本研究显示,黄连解毒汤、AICAR 均能提高炎症损伤内皮细胞的存活时间,降低内皮细胞凋亡数量,间接反映出黄连解毒汤可能通过提高 P-AMPK、抑制炎症介质起到保护炎症损

伤内皮细胞的作用。从炎症损伤内皮细胞与 AS 形成的角度来看,黄连解毒汤可能通过激活 AMPK、抑制炎症介质 ICAM-1 等起到抗 AS 的作用,通过提高 P-AMPK 水平可能会成为临床治疗 AS 新的靶点,也为进一步研究内皮炎症损伤所致的 AS 打下基础。

参考文献:

- [1] Kher N, Marsh J D. Pathobiology of atherosclerosis: a brief review [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2004, 30(6): 665-672.
- [2] Wang L, Hao Q, Wang Y D, et al. Protective effects of dehydroepiandrosterone on atherosclerosis in ovariectomized rabbits via alleviating inflammatory injury in endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(1): 47-57.
- [3] 王县委, 桑文凤, 裴强, 等. 静脉注射脂多糖联合高脂饲料建立兔动脉粥样硬化模型 [J]. 新乡医学院学报, 2013, 30(12): 948-950, 954.
- [4] 刘轶洋. 黄连解毒汤治疗 SIRS 的疗效分析 [J]. 实用医技杂志, 2008, 15(28): 3886-3887.
- [5] 张萌. AMPK 通过 mTOR 途径影响大鼠血管平滑肌细胞增值的研究 [D]. 广州: 广州医学院, 2010.
- [6] 郑丽美, 张君, 徐文静, 等. AMPK 抑制 NF- κ B 信号及炎症反应的研究进展 [J]. 农垦医学, 2011, 33(5): 431-434.
- [7] 宋珏, 路通, 谢林, 等. 黄连解毒汤抗氧化作用的血清药理学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 118-122.
- [8] Steinberg G R, Kemp B E. AMPK in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(3): 1025-1078.
- [9] Stahmann N, Woods A, Spengler K, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(14): 10638-10652.
- [10] 赵保胜, 刘永刚, 王秀丽. 黄连解毒汤解热、抗炎作用研究 [J]. 中国实验方剂学, 2009, 15(11): 55-57.
- [11] Bai A, Ma A G, Yong M, et al. AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(11): 1708-1717.
- [12] 阿布米提·阿不都哈尔, 布力布丽·巴哈提, 徐佩茹. 白细胞介素-6、白细胞介素-10 及血管黏附因子-1 在儿童阻塞性睡眠呼吸暂停-低通气综合征中的变化及意义 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(4): 274-278.
- [13] 喜坤, 靳隼, 杨玉新, 等. 长期联合应用噻吗洛尔对结膜组织炎症标记物 ICAM-1 和 HLA-DR 表达的影响 [J]. 眼科新进展, 2012, 32(6): 517-520.
- [14] Dnsky H M, Barlow C B, Lominska C, et al. Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(10): 1662-1667.
- [15] 李岩, 王宏敏, 李明, 等. 黄芩素对内毒素诱导的内皮细胞细胞间黏附因子-1 表达的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(4): 436-438.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)